**Bead-based multiplex sandwich ELISA assays**

*Ευχαριστώ ιδιαίτερα τους φοιτητές και τις φοιτήτριες του εργαστηρίου* Εμβιομηχανικής και Βιοϊατρικής Τεχνολογίαςκαι κυρίως τον Δημήτρη Μεσσίνη για την βοήθεια κααι την προθυμία τους!

**Εισαγωγικά**

Multiplex Assay

Assay είναι μια αναλυτική εργαστηριακή διαδικασία που χρησιμοποιείται στην ιατρική, την φαρμακολογία, την περιβαλλοντική βιολογία και την μοριακή βιολογία. Στόχος είναι η ποιοτική αξιολόγιση ή η ποσοτική μέτρηση της παρουσίας ή ποσότητας μιας ουσίας (αντίσωμα, αναλύτη, πρωτεΐνη) σε ένα δείγμα (πχ υγρό διάλυμα). Η ουσία συνήθως ονομάζεται αναλύτης ή στόχος προσδιορισμού. Συνήθως αποσκοπεί στο να μετρηθεί μια συγκεκριμένη ιδιότητα του στόχου και να εκφραστεί σε σχετική μονάδα μέτρησης (πχ. πυκνότητα).

Η μέθοδος multiplex είναι ένα είδος δοκιμής (assay) που επιτρέπει την ταυτόχρονη μέτρηση πολλών συστατικών σε έναν μόνο κύκλο δοκιμής.

Όταν πρόκειται για συγκεκριμένο εύρος εφαρμογών μπορεί να καταταχτεί ως “low-plex” ή “mid-plex”, ανάλογα με το πόσους διαφορετικούς στόχους μπορεί να μετρήσει σε κάθε δοκιμή.

Χρησιμοποιείται ευρέως σε πειράματα που θέλουν να ανιχνεύσουν βιομόρια (πχ mRNA, πρωτεΐνες) μέσα σε ένα δείγμα για να καθορίσουν την επίδραση μιας πειραματικής θεραπείας ητην επίδραση μιας μετάλλαξης του DNA.

ELISA ονομάζεται το τεστ που χρησιμοποιεί αντισώματα και αλλαγή χρώματος για να ανιχνεύσει μια ουσία.

Στην περίπτωση του sandwich ELISA, η ουσία (πχ. Πρωτεΐνη) δεσμεύεται ανάμεσα σε δύο αντισώματα. Συνήθως το sandwich βρίσκεται πάνω σε ένα μικροσφαιρίδιο, εσωτερικά βαμμένο με χρωστική ουσία, που λέγεται bead.

Luminex

Το luminex είναι ένα μηχάνημα ανίχνευσης αντιγόνων (πχ πρωτεϊνών). Η ανίχνευση τους αποτελεί το τελικό στάδιο μιας διαδικασίας με την ευρύτερη ονομασία Multiplex assay.

Αφού τα δείγματα ετοιμαστούν, η πλάκα multiwell, περιέχοντας τα δείγματα με τα αντιγόνα, τοποθετείται στο luminex, το οποίο διαδοχικά «ρουφάει» το περιεχόμενο από τα well και μετράει την φωτεινότητα που εκπέμπουν.



Η πρωτεΐνη που θελήσαμε να ανιχνεύσουμε είναι η BMP2.

**Ορολογία**

Beads

Είναι εσωτερικά βαμμένα μικροσφαιρίδια διαμέτρου 5.6μm, που χρησιμοποιούνται ως επιφάνεια πρόσδεσης του πρώτου αντισώματος από τα δύο που χρησιμοποιούνται για να δημιουργήσουν την bead-based sandwich ELISA.

Αντισώματα

Μεγάλα πρωτεϊνικά μόρια σχήματος Υ που χρησιμοποιούνται από το ανοσοποιητικό σύστημα για να αναγνωρίσει και να ακινητοποιήσει ξένα αντικείμενα όπως είναι τα βακτήρια και οι ιοί. Το αντίσωμα αναγνωρίζει ένα μοναδικό κομμάτι του εισβολέα που ονομάζεται αντιγόνο. Κάθε κορυφή της δομής Υ περιέχει μια δομή ανάλογη με κλειδαριά που είναι ειδική για ένα συγκεκριμένο σήμα σε ένα αντιγόνο επιτρέποντας στις δύο δομές να συνδέονται με ακρίβεια. Με την σύνδεση ένα αντίσωμα μπορεί να καταδείξει ένα μικρόβιο ή ένα μολυσμένο κύτταρο για επίθεση από άλλα κομμάτια του ανοσοποιητικού συστήματος, ή να εξουδετερώσει το στόχο του απευθείας.

Αντιγόνα

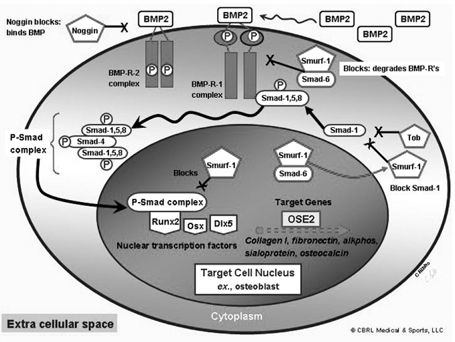
Σύνθετα μόρια (πρωτεΐνη, πολυσακχαρίτης, λιπίδιο και νουκλεϊνικό οξύ) που μπορούν να αντιδράσουν με αντισώματα. Ιστορικά, η λέξη πήρε την ονομασία της από την ικανότητα του μορίου να παράγει αντισώματα. Σήμερα με τον όρο *αντιγόνο* νοείται κάθε ξένη ουσία που όταν εισέρχεται σε έναν οργανισμό (π.χ. θηλαστικά) αναγνωρίζεται από τα B-λεμφοκύτταρα και/ή Τ-λεμφοκύτταρα και μπορεί να προκαλέσει την ανάπτυξη της ειδικής ή επίκτητης ανοσίας.

Τα αντιγόνα μπορεί να είναι τοξίνες, όπως το δηλητήριο των φιδιών, ή ακόμη και μόρια στην επιφάνεια των κυττάρων, (όπως για παράδειγμα τα αντιγόνα Α/Β στα ερυθρά αιμοσφαίρια).

BMP (Bone Morphogenetic Proteins)

Μια ομάδα πρωτεϊνών γνωστών και ως «κυτοκίνες» και «metabologens». Μέσω κεντρικών μορφογενετικών σημάτων, συμβάλουν στην διαμόρφωση διαφόρων ιστών. Η μη εύρυθμη λειτουργία της ομάδας BMP έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση διάφορων ασθενειών: η κακός ρυθμισμένη αποστολή σημάτων της BMP συνδέεται με την εμφάνιση καρκίνου (η απουσία της αποτελεί σημαντικό παράγοντα στην εμφάνιση καρκίνου του ορθού και η υπερδραστηριότητα της στην εμφάνιση αδενοκαρκινόματος).

Λειτουργεί ως εξής: η BMP αλληλεπιδρά με συγκεκριμένους υποδοχείς στην επιφάνεια του κυττάρου, τα BMPRs (Bone Morphogenetic Protein Receptors). Η μεταφορά σήματος από τους BMPRs κινητοποιεί μέλη της οικογένειας πρωτεϊνών SMAD μέσα στο κύτταρο, που μαζί με την BMP, συμβάλουντελικά στην ανάπτυξη ιστών και οργάνων όπως η καρδιά, το ΚΝΣ και οι χόνδροι.



BMP2 (Bone Morphogenetic Protein 2)

Μία πρωτεΐνη της οικογένειας πρωτεϊνών BMP που συμμετέχει στην ανάπτυξη των οστών και των χόνδρων, αλλά και στην διαφοροποίηση των καρδιακών κυττάρων.

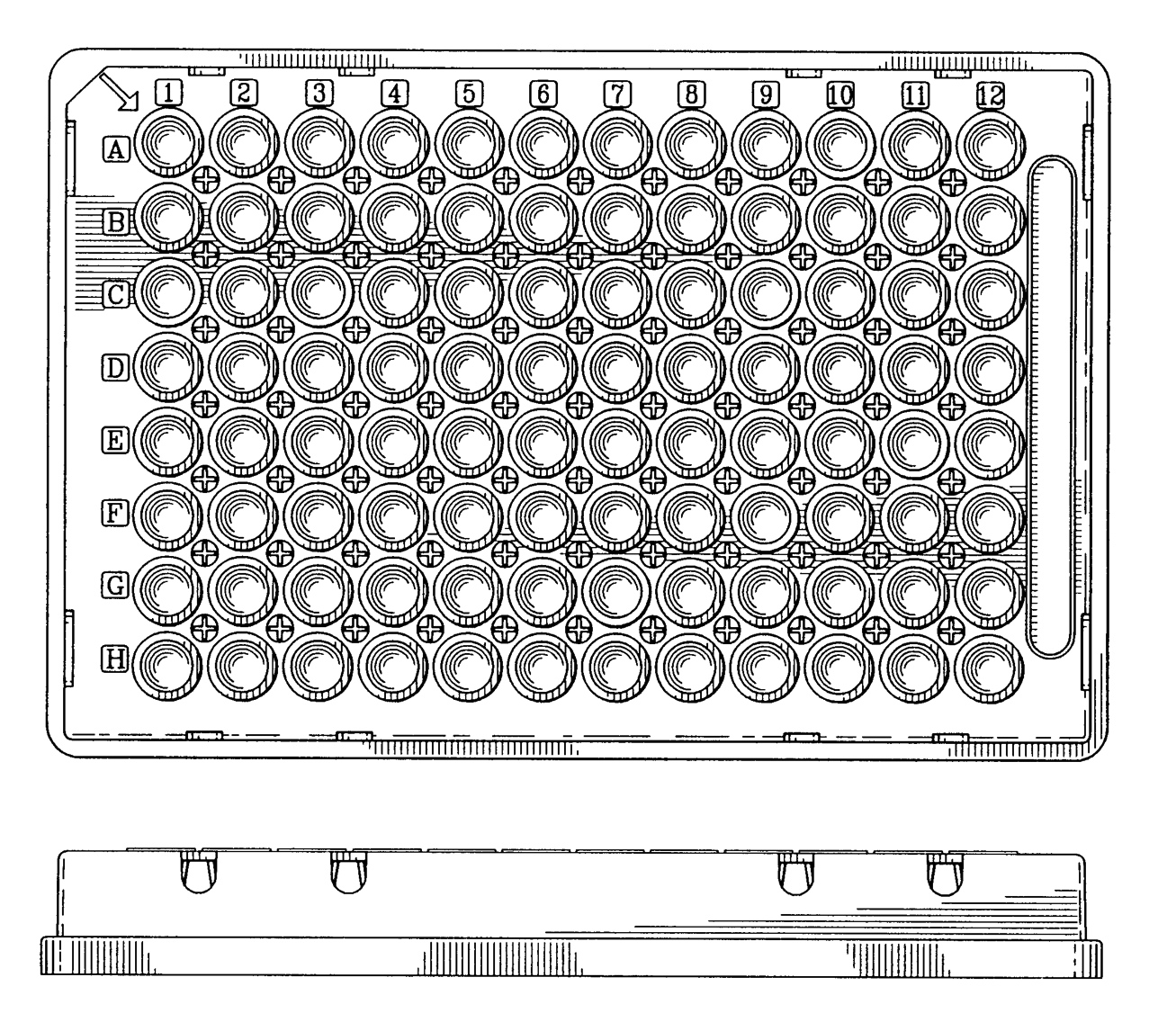
FI (Fluorescence Intensity)

Είναι ένα μέγεθος που περιγράφει την ένταση φθορισμού. Η συσκευή της Luminex υπολογίζει το FI κάθε μικροσφαιριδίου που αναλύει.

MFI (Median Fluorescence Intensity)

Η MFIείναι η μέση ένταση φθορισμού υπολογισμένη από τη διάμεση τιμή (median) όλων των μικροσφαιριδίων.

Πλάκα multiwell



Πιπέτα

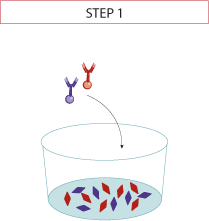


Χρησιμοποιείται για την ακριβή μέτρηση και μεταφορά ακριβούς, αρκετά μικρού, όγκου υγρού.

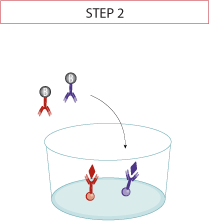
**Αρχή λειτουργίας του πειράματος**

Σε διάλυμα που περιέχει μια συγκέντρωση του στόχου (πχ πρωτεΐνη) προστίθενται beads (σφαιρίδια), εσωτερικά βαμμένα με φθορίζουσες χρωστικές ουσίες, ώστε να παράγουν μια συγκεκριμένη φασματική διεύθυνση, επικαλυμμένα με ειδικά αντισώματα που συζεύουν τον συγκεκριμένο στόχο (πχ πρωτεΐνη).

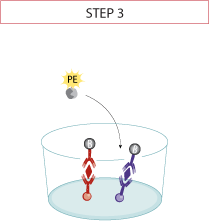
Έπειτα προστίθενται τα βιοτινυλιωμένα αντισώματα ειδικά για την ανίχνευση του αναλύτη ενδιαφέροντος και σχηματίζουν ένα σάντουιτς αντισώματος-αντιγόνου-αντισώματος.



Βήμα 1: beads ενισχυμένα με captureAb προστίθενται στο διάλυμα και δεσμεύουν τον στόχο

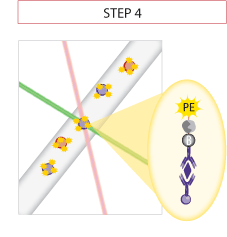


Βήμα 2: βιοτυλιομένα αντισώματα ανίχνευσης προστίθενται και δημιουργούν sandwich αντισώματος-αντιγόνου-αντισώματος



Βήμα 3: προστίθεται μόριο Streptavidin (SA) ενωμένο με φυκοερυθρίνη (PE)

και το avidin κολλάει με το biotin του αντισώματος.



Βήμα 4: τα beads «διαβάζονται» από το μηχάνημα luminex

**Πρωτόκολλο**

**Εξοπλισμός**

-96-well plate shaker at 4C

-luminex magnetic separator

-1x flat bottom 96-well plate

-1x aluminum plate sealer

-4x clear plate sealers

-4x 50ml reagent reservoir (boats)

**Υλικά**

-assay buffer (PBS with 1%BSA, pH 7.4)

-SAPE (MOSS SAPE-001 or Invitrogen S866)

-bead and detection mix

*For all steps involving bead handling, avoid to expose them to direct sunlight or too much light in general (they are photophobic)*

1. Προσθέτουμε assay buffer σε ένα δοχείο με την ετικέτα «assay» και ετοιμάζουμε την πλάκα luminex
2. Ετοιμάζουμε το μίγμα με τα beads
3. Προσθέτουμε τα beads σε μια πλάκα 96-wellflatbottom
4. Τοποθετούμε την πλάκα στον διαχωριστή, περιμένουμε 1 λεπτό και χύνουμε το υπερκείμενο
5. Προσθέτουμε 100μl από το «assay» με μια πιπέτα
6. Τοποθετούμε την πλάκα στον διαχωριστή, περιμένουμε ένα λεπτό και χύνουμε το υπερκείμενο
7. Μεταφέρουμε 50μl από τα δείγματα στην πλάκα luminex
8. Καλύπτουμε την πλάκα με platesealer και την ανακατεύουμε στην μέγιστη ταχύτητα για 90 λεπτά
9. 15 λεπτά πριν τη λήξη της επώασης, ετοιμάζουμε το μίγμα με τα αντισώματα ανίχνευσης (20μl σε κάθε well)
10. Τοποθετούμε την πλάκα στον διαχωριστή, περιμένουμε 1 λεπτό και χύνουμε το υπερκείμενο
11. Προσθέτουμε 100μl από το «assay» με μια πιπέτα
12. Τοποθετούμε την πλάκα στον διαχωριστή, περιμένουμε 1 λεπτό και χύνουμε το υπερκείμενο
13. Προσθέτουμε 100μl από το «assay» με μια πιπέτα
14. Τοποθετούμε την πλάκα στον διαχωριστή, περιμένουμε 1 λεπτό και χύνουμε το υπερκείμενο
15. Προσθέτουμε το μίγμα με τα αντισώματα ανίχνευσης (20μl σε κάθε well)
16. Καλύπτουμε την πλάκα με platesealer και την ανακατεύουμε στην μεγαλύτερη ταχύτητα για 60 λεπτά
17. Στο μεταξύ, ακολουθούμε το ημερήσιο πρωτόκολλο έναρξης του luminex και ετοιμάζουμε το πρωτόκολλο luminex
18. 15 λεπτά πριν το τέλος της επώασης προετοιμάζουμε το μίγμα SAPE, διαλύοντας 1:200 το stockSAPE μέσα σε assaybuffer (50μl σε κάθε well)
19. Ανοίγουμε το εργαλείο luminex 200 και ανοίγουμε το λογισμικό xPonent. Βεβαιωνόμαστε ότι το δοχείο waste είναι άδειο και ότι το υγρό sheath είναι αρκετό. Συνδεόμαστε και πατάμε την καρτέλα συντήρησης.
20. Πραγματοποιούμε το ζέσταμα (που γίνεται αυτόματα από τη στιγμή που θα εκκινήσουμε το όργανο). Ρίχνουμε alcoholflush με 70% αιθανόλη στο ντεπόζιτο, πλένουμε με υγρό sheath
21. Δημιουργούμε νέο πρωτόκολλο. Το ονομάζουμε και επιλέγουμε: set Version to 1, DD Gating to 7000-20000 and select Magnetic beads and High PMT
22. Έπειτα, επιλέγουμε της περιοχές των beads που θα χρησιμοποιήσουμε και μετονομάζουμε τους αναλύτες χρησιμοποιώντας τα σηματοδοτημένα ονόματα που σκοπεύουμε να μετρήσουμε
23. Έπειτα, επιλέγουμε από ποια well θα πραγματοποιήσουμε τις μετρήσεις και πατάμε το κίτρινο κουμπί U. Αλλάζουμε τα ID των well στα ονόματα των δειγμάτων. Σώζουμε τις αλλαγές.
24. Δημιουργούμε νέο batch από ένα ήδη υπάρχων πρωτόκολλο.
25. Τοποθετούμε την πλάκα στον διαχωριστή, προσθέτουμε 100μl assay buffer σε κάθε well με μια πιπέτα, περιμένουμε 1 λεπτό και χύνουμε το υπερκείμενο
26. Προσθέτουμε 100μl assay buffer σε κάθε well με μια πιπέτα
27. Τοποθετούμε την πλάκα στον διαχωριστή, προσθέτουμε 100μl assay buffer σε κάθε well με μια πιπέτα, περιμένουμε 1 λεπτό και χύνουμε το υπερκείμενο
28. Προσθέτουμε το φωτοφοβικό μίγμα SAPE (50μl ανά well)
29. Καλύπτουμε την πλάκα με μονωτική επιφάνεια και ανακινούμε στην μέγιστη ταχύτητα για 15 λεπτά
30. Τοποθετούμε την πλάκα στον διαχωριστή, περιμένουμε 1 λεπτό και χύνουμε το υπερκείμενο
31. Προσθέτουμε 100μl assay buffer σε κάθε well με μια πιπέτα
32. Τοποθετούμε την πλάκα στον διαχωριστή, προσθέτουμε 100μl assay buffer σε κάθε well με μια πιπέτα, περιμένουμε 1 λεπτό και χύνουμε το υπερκείμενο
33. Προσθέτουμε 130μl «assay» με μια πιπέτα
34. Καλύπτουμε την πλάκα με μονωτική επιφάνεια και ανακινούμε στην μέγιστη ταχύτητα για 1 λεπτό
35. Αφαιρούμε την επιφάνεια και τοποθετούμε την πλάκα στο όργανο luminex και πατάμε το κουμπί batch
36. Όταν ολοκληρωθεί η μέτρηση, ακολουθούμε το ημερήσιο πρωτόκολλο τερματισμού του Luminex. Εντωμεταξύ, εξάγουμε τα αποτελέσματα σε ένα αρχείο .cvs
37. Αποστειρώνουμε το ρεζερβουάρ με αιθανόλη 70% και νερό DI
38. Κλείνουμε τους διακόπτες και τερματίζουμε την λειτουργία του υπολογιστή

**Πείραμα**

Προκειμένου να εκτελέσουμε το πρωτόκολλο πρέπει πρώτα να φτιάξουμε τα samples. Για να τα φτιάξουμε ακολουθούμε μια διαδικασία που λέγεται Serial 2-fold dilution of BMP2 protein

Χρησιμοποιήσαμε τρεις σειρές με 8 wells η καθεμία, κάναμε δηλαδή τρεις φορές την ίδια δοκιμή.

**Δημιουργία samples**

Στο πρώτο well βάζουμε 200μlBMP2. Στα υπόλοιπα, βάζουμε από 100μl assay buffer. Με μία πιπέτα παίρνουμε από το πρώτο well 100μl BMP2 και το αναμιγνύουμε με το περιεχόμενο του επόμενου well. Μόλις το αναμίξουμε, παίρνουμε πάλι με την πιπέτα 100μlαπό το μίγμα και επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία για όλα τα well εκτός του τελευταίου. Έτσι, πετυχαίνουμε να έχουμε σταδιακά μικρότερη συγκέντρωση BMP2 όσο προχωράμε.

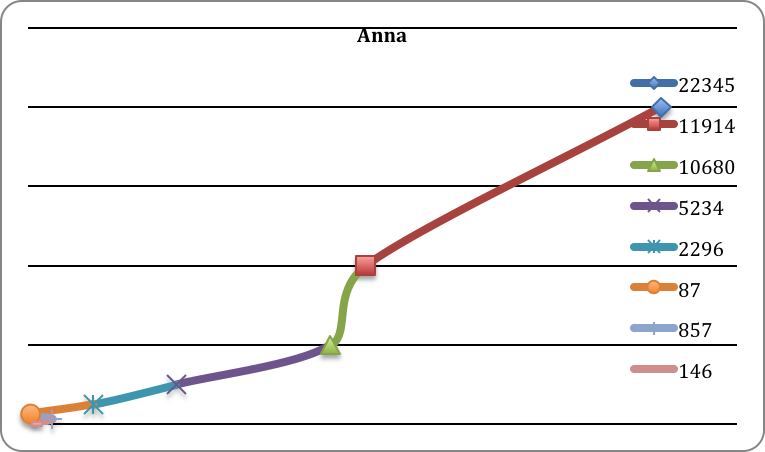
Αφού πλέον έχουμε τα samples ακολουθούμε κανονικά την διαδικασία που περιγράφεται στο πρωτόκολλο.

**Σκοπός του πειράματος - Αποτελέσματα**

Σκοπός του πειράματος είναι η καταγραφή των MFI που εκπέμπει κάποιο συγκεκριμένο αντιγόνο, προκειμένου να μπορεί να αναγνωριστεί σε περίπτωση που θέλουμε να αναλύσουμε ένα δείγμα με άγνωστη σύσταση.

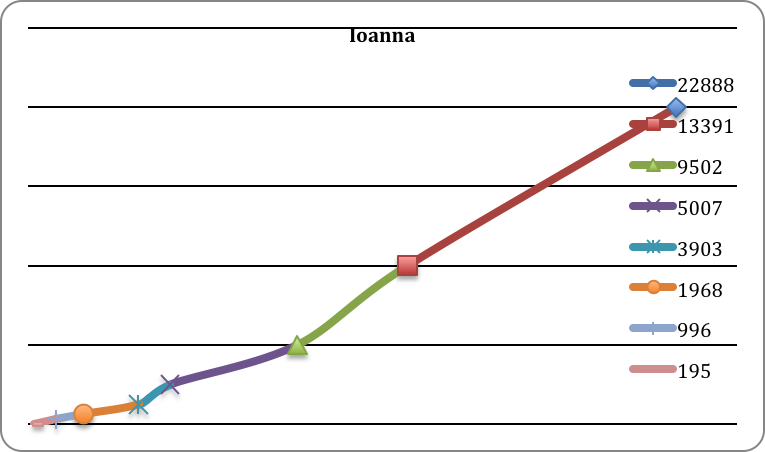
Στην δική μας περίπτωση, τα πείραμα έγινε κυρίως για λόγους εξοικείωσης με τα αντικείμενο και την διαδικασία, οπότε δεν θα γίνει ποιοτική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων αλλά απλά παρουσίαση τους.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Anna** | **MFI** | **PG/ML** |
| 1(1,A1) | 22345 | 20000 |
| 2(1,B1) | 11914 | 10000 |
| 3(1,C1) | 10680 | 5000 |
| 4(1,D1) | 5234 | 2500 |
| 5(1,E1) | 2296 | 1250 |
| 6(1,F1) | 87 | 625 |
| 7(1,G1) | 857 | 313 |
| 8(1,H1) | 146 | 0 |



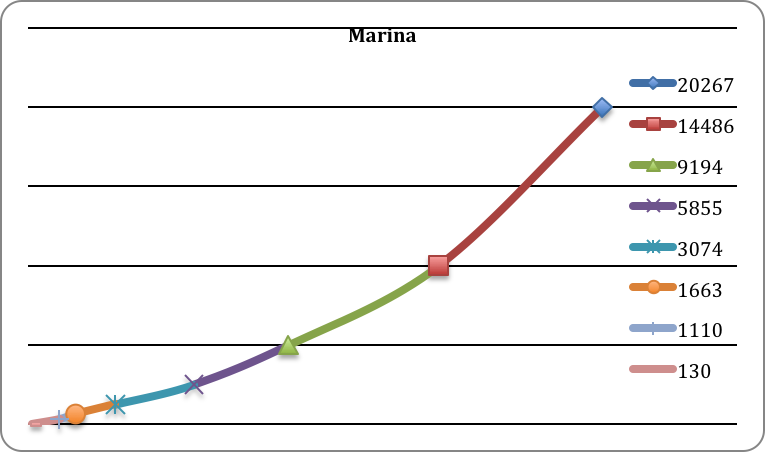
Αποτελέσματα και διάγραμμα των μετρήσεων της πρώτης σειράς wells.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Ioanna** | **MFI** | **PG/ML** |
| 9(1,A2) | 22888 | 20000 |
| 10(1,B2) | 13391 | 10000 |
| 11(1,C2) | 9502 | 5000 |
| 12(1,D2) | 5007 | 2500 |
| 13(1,E2) | 3903 | 1250 |
| 14(1,F2) | 1968 | 625 |
| 15(1,G2) | 996 | 313 |
| 16(1,H2) | 195 | 0 |



Αποτελέσματα και διάγραμμα των μετρήσεων της πρώτης σειράς wells.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Marina** | **MFI** | **PG/ML** |
|  |  |  |
| 17(1,A3) | 20267 | 20000 |
| 18(1,B3) | 14486 | 10000 |
| 19(1,C3) | 9194 | 5000 |
| 20(1,D3) | 5855 | 2500 |
| 21(1,E3) | 3074 | 1250 |
| 22(1,F3) | 1663 | 625 |
| 23(1,G3) | 1110 | 313 |
| 24(1,H3) | 130 | 0 |



Αποτελέσματα και διάγραμμα των μετρήσεων της τρίτης σειράς wells.

**Βιβλιογραφία - Πηγές**

http://ucflow.blogspot.gr/2009/04/what-is-mfi.html

http://www.luminexcorp.com/TechnologiesScience/xMAPTechnology/

http://www.weizmann.ac.il/Biological\_Chemistry/scientist/Bayer/avidin\_biotin